

学校编码: 10384  
学号: 200426032

分类号\_\_\_\_\_密级\_\_\_\_\_  
UDC\_\_\_\_\_

厦 门 大 学

硕 士 学 位 论 文

盐单胞菌分离、鉴定及其  
二氨基庚二酸脱羧酶基因克隆与表达

Isolation and Identification of a Strain of *Halomonas* sp.  
and its DAPDC Gene (*lys A*) Clone and Expression

周 韬

指导教师姓名: 刘 广 发 教授  
专 业 名 称: 水 生 生 物 学  
论文提交日期: 2007 年 5 月 8 日  
论文答辩时间: 2007 年 6 月 4 日  
学位授予日期: 2007 年 月

答辩委员会主席: 高亚辉  
评 阅 人: \_\_\_\_\_

2007 年 6 月

## 厦门大学学位论文原创性声明

兹提交的学位论文，是本人在导师指导下独立完成的研究成果。本人在论文写作中参考的其他个人或集体的研究成果，均在文中以明确方式标明。本人依法享有和承担由此论文而产生的权利和责任。

声明人：

年 月 日

# 厦门大学学位论文著作权使用声明

本人完全了解厦门大学有关保留、使用学位论文的规定。厦门大学有权保留并向国家主管部门或其指定机构送交论文的纸质版和电子版，有权将学位论文用于非赢利目的的少量复制并允许论文进入学校图书馆被查阅，有权将学位论文的内容编入有关数据库进行检索，有权将学位论文的标题和摘要汇编出版。保密的学位论文在解密后适用本规定。

本学位论文属于

1、保密（ ），在      年解密后适用本授权书。

2、不保密（ ）

（请在以上相应括号内打“√”）

作者签名：

日期：      年    月    日

导师签名：

日期：      年    月

## 目 录

## 摘要

## Abstract

1 前言.....	1
1.1 细菌鉴定的方法.....	1
1.2 嗜盐单胞菌的研究现状 .....	7
1.3 基因克隆研究策略.....	15
1.4 二氨基庚二酸脱羧酶基因 ( <i>lys A</i> ) 研究概况.....	27
1.5 本实验的意义.....	30
2 材料与方法.....	32
2.1 材料.....	32
2.2 实验方法.....	36
3 结果与分析.....	47
3.1 嗜盐菌的分离鉴定.....	47
3.2 ZL-4 菌的生理参数.. ..	53
3.3 ZL-4 菌外膜蛋白.....	56
3.4 ZL-4 菌部分基因组文库的构建与鉴定.....	57
3.5 ZL-4 菌部分克隆子测序和BLAST 分析.....	58
3.6 <i>lys A</i> 基因的克隆和原核表达.....	62
3.7 DAPDC 功能研究.....	65
4 讨论.....	69
5 小结.....	72
6 展望.....	73
参考文献.....	76
致谢.....	82

## Catalog

Abstract (In Chinese)

Abstract (In English)

<b>1 Introduction.....</b>	<b>1</b>
1.1 Introduction of bacteria identification's methods.....	1
1.2 Progress on Moderately halophilic bacteria research .....	7
1.3 Introduction of common methods in gene clone.....	15
1.4 Research on DAPDC gene ( <i>lys A</i> ).....	27
1.5 The purpose and meaning of this experiment. ....	30
<b>2 Materials and methods.....</b>	<b>32</b>
2.1 Materials.....	32
2.2 Methods.....	36
<b>3 Results.....</b>	<b>47</b>
3.1 Isolation and identification of a Moderately halophilic bacteria.....	47
3.2 Growth physiology of ZL-4.....	53
3.3 Outer membrane proteomics of <i>Halomonas</i> sp.ZL-4.....	56
3.4 <i>Halomonas</i> sp.ZL-4 gene library construction.....	57
3.5 the positive clones sequence alignment analysis.....	58
3.6 Clone and expression of gene <i>lys A</i> .....	62
3.7 Study on DAPDC function.....	65
<b>4Discussion.....</b>	<b>69</b>
<b>5Conclusion.....</b>	<b>72</b>
<b>6Expectation.....</b>	<b>73</b>
References.....	76
Acknowledge.....	82

## 摘 要

*lys A* 基因编码二氨基庚二酸脱羧酶 (DAPDC), 该酶将二氨基庚二酸 (DAP) 转化为 L-Lys, 因此 DAPDC 对细菌的生长和生存至关重要。本实验从盐生杜氏藻高盐培养液中分离纯化了一株盐单胞菌, 并从形态、生理以及 16S rDNA 等方面进行初步鉴定, 将它命名为 *Halomonas* sp.ZL-4。

采用鸟枪法构建了 *Halomonas* sp.ZL-4 部分基因组文库。提取 *Halomonas* sp.ZL-4 的总 DNA, 经限制性核酸内切酶 *Sau* 3A I 消化后回收 1~6 kb 大小的酶切片段, 与经限制性核酸内切酶 *Bam* HI 酶切消化、回收后的质粒 pUC19 连接, 热转化感受态细胞 *E.coli* DH5  $\alpha$ 。在此基础上, 进行克隆子的测序工作。通过与数据库中已知序列进行比对, 获取了 *lys A* 基因的信息。将该基因经 PCR 扩增回收后, 采用限制性内切酶 *Bam* HI 和 *Eco* RI 进行双酶切, 同时对 pET-32a 载体进行了相应双酶切。将两者回收后连接, 转化大肠杆菌 BL21, 构建成重组质粒 pET-*lys A*。重组子 pET-*lys A* 和对照 pET-32a 经原核诱导表达后, 对比分析了两者细胞总赖氨酸和细胞外赖氨酸含量, 发现重组子赖氨酸产量显著高于原始菌株, 并且随着培养时间延长赖氨酸逐渐分泌到细胞外。此外还对比分析了重组子和对照的 DAPDC 粗酶提取液在相同条件下的酶促反应, 结果表明重组子 DAPDC 的酶活性是对照的 1.78 倍。可见克隆的 *lys A* 基因已经转入受体菌并具有较高的活性。

关键词: *Halomonas* sp. ; *lys A* 基因 ; DAPDC

## Abstract

DAPDC is a vitamin B6-dependent enzyme that stereospecifically converts *meso*-DAP to L-lysine. The enzyme is of interest because of its importance in bacterial growth and survival. Lysine is essentially required in protein biosynthesis and for their viability and development. So biosynthesis of L-lysine has come under increased scrutiny as a target for novel antibacterial agents.

A strain of halophilic bacterium was isolated from a high NaCl concentration medium cultured with *D.salina*. Based on the analysis of bacterial 16S rDNA, cell morphology, physiological and biochemical characteristics, the strain was designated as *Halomonas* sp.ZL-4. Then total DNA of the strain was extracted and partially digested by *Sau* 3AI, the DNA fragments ranged from 1~6 kb were retrieved and linked with pUC19 to form reconstructed plasmids. Then they were transformed into *E.coli* DH5 $\alpha$  to construct a partial gene library of *Halomonas* sp.ZL-4. Fifty clones growing on the screening medium were randomly selected, and then the DNA fragments within the reconstructed plasmids were sequenced and taken a homologous BLAST by dint of America GenBank to seek the gene we need until a gene (*lys A*) that coding for diaminopimelate decarboxylase (DAPDC) has been found. After that, the *lys A* gene was amplified by PCR and ligated with vector pET32a to reconstruct a new plasmid pET-*lysA*. The latter was then transformed into *E.coli* BL21. New transformant (with pET-*lysA*) was cultured and shaken at 37°C in LB medium supplemented with 1mmol/L isopropyl- $\beta$ -d-thiogalactopyranoside (IPTG) over 8 h, then total- and extracellular- amount of L-lysine of the samples were detected. The results showed that the yield of L-lysine of transformant was markedly more than control, its L-lysine in the cell was excreted outside slowly. Furthermore, DAPDC activity has been tested between transformant and control by means of their crude extracts. Evidence proved that the activity of the former was 1.78 times than control.

In sum, all the data mentioned above implied that the cloned foreign *lys A* gene has been transformed into *E. coli* BL21 and expressed high level catalyzing activity.

Keywords: *Halomonas* sp; *lysA* gene; DAPDC

## 1 前言

### 1.1 细菌鉴定的方法

细菌分类鉴定方法包括表型鉴定法和分子遗传学鉴定法两大类,分成4个水平:细菌形态和生理生化水平、细胞组分水平、蛋白质水平和核酸水平。表型鉴定法是对前3个水平的鉴定,包括常规鉴定法、数值分类鉴定法和化学分类鉴定法。分子遗传学鉴定法<sup>[1]</sup>是核酸水平的鉴定,对细菌染色体或质粒DNA进行分析,包括G+C mol%含量测定、核酸杂交、PCR技术、16SrRNA和16~23SrRNA序列分析、全基因组测序等,此类方法将细菌种属定位和亲缘关系判别由表型特征深化为基因型鉴定。

#### 1.1.1 细菌常规鉴定法

细菌常规鉴定法是细菌形态和生理生化水平及蛋白质水平的鉴定方法,前者是最经典、常用的分类鉴定指标,也是现代化细菌分类鉴定的依据;后者包括免疫诊断技术、蛋白质图谱分析和氨基酸序列分析等。

#### 1.1.2 细菌形态和生理生化水平鉴定

参照《伯杰氏细菌鉴定手册》<sup>[2]</sup>, 主要根据细菌的形态、结构以及生理生化特性来确定它们在分类系统中的地位。细菌细胞形状分为球状、杆状和螺旋状。细胞的大小也是细菌鉴定中必不可少的内容,用 $\mu\text{m}$ 作为量度单位。球菌的大小以细胞的直径来表示,一般球菌的直径是 $0.5\sim 1.0\mu\text{m}$ ;杆菌和螺旋菌则是用“宽 $\times$ 长”来表示,杆菌的宽度一般为 $0.5\sim 1.0\mu\text{m}$ ,长度为宽度的一倍或几倍。

细菌细胞的结构在细菌分类中占有重要地位。细胞壁、芽胞、荚膜、鞭毛、内含物等细胞结构体都是必需检测的项目。不同的结构部位可以通过革兰氏染色法、芽胞染色法、荚膜染色法和鞭毛染色法来检测。菌体特征包括菌落形态、菌苔特征和液体培养特征等方面。细菌常规鉴定的生理生化试验有氧化酶试验、接触酶试验、葡萄糖氧化试验、糖发酵试验、乙酰甲基甲醇试验(V.P.)试验、明胶液化试验、淀粉水解试验、硝酸盐还原试验、产氨试验、硫化氢产生试验、吲哚(indole)产生试验、石蕊牛奶试验以及碳源与氮源利用试验等。细菌的生态条件指对细菌的生长繁殖有一定影响的其它生活条件,如温度、pH、需氧性和耐盐性等。



### 1.1.3 细菌蛋白质水平鉴定

细菌蛋白质水平鉴定主要包括免疫诊断技术、蛋白质图谱分析和蛋白质序列分析等。免疫诊断技术主要包括凝集实验、免疫酶技术、免疫荧光技术、放射免疫测定技术和免疫胶体金标记技术<sup>[3]</sup>，简介如下：

目前常用的凝集试验是葡萄球菌协同凝集试验（SPA-CoA）。金黄色葡萄球菌细胞壁的 A 蛋白（SPA）能与动物血清中 IgG 的 Fc 结合，成为致敏的颗粒载体，特异性 IgG 的 Fc 与 SPA 结合后，F（ab'）<sub>2</sub> 段暴露在葡萄球菌表面，与相应细菌反应呈现凝集现象，此法可用于细菌快速鉴定和分型。免疫酶技术（EIA，Enzyme immunoassay）是将酶标记的抗体与抗原-抗体复合物结合形成抗原-抗体-酶标记抗体复合物，加入酶底物产生有色产物。以酶联免疫吸附测定（ELISA）和斑点酶联免疫吸附技术（Dot-ELISA）应用较广泛。免疫荧光技术（FIA，Fluorescence immunoassay）是将一抗滴加于待检抗原上，再加一抗的荧光抗体（二抗），呈现特异性的荧光抗原抗体复合物以鉴定病原菌。此法比 ELISA 更直观，可直接观察到菌体形态。放射免疫测定（RIA，Radioimmunoassay）是用放射性同位素标记抗原或抗体，与相应的抗体或抗原结合后通过放射自显影定性和定量抗原或抗体。胶体金是继酶、荧光素和放射同位素后免疫标记技术中令人瞩目的新标记物，是氯金酸（HAuCl<sub>4</sub>）在还原剂如白磷、枸橼酸钠等的作用下，聚合成特定大小的金颗粒。通过静电作用，胶体金与抗体或抗原形成一种稳定的胶体状态，即为免疫金。免疫金与相应的抗原抗体结合后，呈现特定的颜色反应。

蛋白质图谱分析主要采用聚丙烯酰胺凝胶电泳（PAGE，Poly Acrylamide Gel Electrophoresis）和 SDS-PAGE。SDS-PAGE 的原理是根据分子量的不同分离蛋白质。SDS 是一种阴离子表面活性剂，与蛋白质疏水部分结合使蛋白质带大量负电荷且使蛋白质的形状趋向一致，抵消了蛋白质本身所带电荷和形状的影响，因此，样品分子量的对数与其在凝胶中的迁移率呈直线关系。

蛋白质序列分析可以通过 PCGENE，GCG 软件包依次进行序列组成、初级结构。二级结构分析，以及核酸与蛋白的同源比较等工作<sup>[4]</sup>。

### 1.1.4 数值分类鉴定法

数值分类法（Numerical Taxonomy）是近 20 年来发展起来的细菌分类理论，又

称聚类分类或安德生 (Adanson) 法。本方法利用数理统计的方法来处理细菌的各种特征, 求出相似值, 再以相似值的大小决定细菌在分类学中的关系, 把它们分为各个类群。数值分类与传统分类有显著的不同, 它的特点是采用较多的分类特征, 并根据“等重原则”, 对各个分类特征不分主次, 同等对待。

自动化微生物鉴定系统即采用数值分类原理。微生物数值分类鉴定集数学、电子、信息及自动分析技术于一体, 具有系统化、标准化、微量化和简易化等优点。商品化的鉴定测试卡可对不同来源的标本进行鉴定, 所得结果以数字方式表达。通过与数据库 (手册或软件) 中的数据对比得出鉴定结果, 可将未知菌鉴定到属、种、亚种或生物型。

### 1.1.5 化学分类鉴定法

20 世纪 50 年代中期由 Cummins 和 Harris 建立的化学分类鉴定法主要通过对细菌细胞壁化学成分即氨基酸和糖的分析进行分类鉴定。细菌属的分类主要测定其细胞壁各种氨基酸组分, 种的鉴定主要是对糖的分析。另外, 还有全细胞水解液糖型分析、脂肪酸分析、磷酸类脂成分分析、枝菌酸分析、醌类分析和光合色素成分分析等。通常使用红外光谱、气相色谱、高效液相色谱和质谱等新技术。

### 1.1.6 分子遗传学鉴定法

#### 1.1.6.1 细菌染色体 DNA G+C mol%含量测定

细菌 DNA 中 G+C 含量的测定是细菌分类鉴定中的一个能反映属、种间亲缘关系的遗传型指征。不同生物种的 G+C 含量是不同的, 生物种之间的亲缘关系越远, 其 G+C 含量差别就越大, 反之亦然。而且, 细菌中 G+C 含量比较稳定, 它不受菌龄的影响, 也不因外界条件的改变而改变, 因而对细菌鉴定有很高的应用价值。单纯根据 G+C 含量来判断, 数值相同的细菌未必是种类相同或相近的细菌, 而数值不相同, 肯定不会是同种或相近的属种。因此, 在细菌鉴定和分类中, 一般总是将 G+C 含量与表型特征相结合来进行分析。细菌染色体 DNA G+C mol%含量测定对表型相似的疑难菌株鉴定、新的分类单位建立和细菌亲缘关系判定等是一项重要的分类鉴定指标和参考标准。其实验方法包括纸层析法、浮力密度法、高效液相色谱法、热变性温度 ( $T_m$ ) 法和荧光法等。

#### 1.1.6.2 核酸杂交技术

核酸杂交技术是根据碱基互补配对原理，将 2 条不同来源的单链核酸进行复性以鉴定菌株间的亲缘关系，包括：DNA-DNA（Southern 杂交）、DNA-RNA、RNA-RNA（Northern 杂交）和 PNA-DNA 杂交（PNA 为肽核酸）。DNA-DNA 杂交适用于种水平的研究，而 DNA-rRNA 杂交适用于属和属以上水平的分类研究。核酸杂交目前常采用固相杂交法，即把待测菌株双链核酸热解成单链，固定在硝酸纤维素滤膜等固相支持物上。然后把参照菌株的解链单链核酸酶切并进行同位素标记，制成探针，再跟固相支持物上的待测菌 DNA 形成新的双链核酸，测定杂合双链的相对放射性强度来确定菌株间的同源性程度。一般认为核酸杂交同源性小于 20% 为不同属，20%~60% 为属内紧密相关的种，60%~70% 为同种内不同亚种，大于 70% 为同一亚种。另外，如果对线粒体 DNA（mtDNA）进行杂交分析将能使种内和种间的分类更加细致、准确。

#### 1.1.6.3 限制性核酸内切酶分析法

限制性核酸内切酶分析法（REA, Restriction Enzyme Analysis）是用限制性核酸内切酶消化不同细菌染色体 DNA，经电泳产生不同长度 DNA 片段的酶切图谱。将该图谱与已知菌的图谱进行比对即可对未知菌进行初步判断。

#### 1.1.6.4 质粒图谱分析法

质粒是独立于细菌染色体之外进行复制的辅助性遗传单位，不是细菌生长繁殖所必需的，但质粒可使宿主菌具有某些非染色体决定的生物学性状，如耐药性、溶血性、细菌毒力等。质粒图谱分析（PP 分析, Plasmid Profile Analysis）是通过比较电泳图谱上质粒 DNA 数目和分子量来分析细菌，该法特异性好、分析周期短、稳定可靠，几乎适用于所有细菌的分型，特别适用于尚未建立标准分型方法和缺乏血清型的菌属（种）的鉴定和分型。

#### 1.1.6.5 脉冲场凝胶电泳分析法

脉冲场凝胶电泳（PFGE, Pulsed-field Gel Electrophoresis）采用定时改变电场方向的交变电源，每次电流方向改变后持续 1~5s 再改变电流方向，如此反复循环。PFGE 运用罕见切点的内切酶切割染色体 DNA，产生 10~800kb 长的 5~20 条大的 DNA 片段。PFGE 是目前分辨力最高的分型方法之一，但技术要求较高。

#### 1.1.6.6 PCR 技术

PCR 技术具有高度的特异性和敏感性，是临床微生物检验的理想工具，可用于

细菌和病毒感染的早期诊断、遗传性疾病的诊断、肿瘤基因分析和法医学诊断等。现已衍生出多种 PCR 技术, 如: 锚定 PCR、反向 PCR、多重 PCR、原位 PCR、不对称 PCR、重复序列 PCR、巢式 PCR、反转录 PCR、差异显示 PCR、免疫 PCR、PCR-ELISA、随机扩增 DNA 多态性分析 (RAPD) 和扩增片段长度多态性 (AFLP) 等。RAPD 又称为随机引物 PCR 法 (AP-PCR), 可用于未知菌株的快速鉴定和流行病学调查, 细菌种间、亚种间乃至株间的亲缘关系分析。AFLP 技术于 1995 年由 Vos 等首次报道, 可用于各种大小的基因组指纹分析, 为研究物种间尤其是原核生物属以下及株间的亲缘关系提供了有效的手段。

#### 1.1.6.7 16SrRNA 序列和 16S~23SrRNA 间区序列分析法

在细菌的系统分类学研究中, 最有用和最常用的分子钟是 rRNA。rRNA 的其种类少、含量大 (约占细菌 RNA 含量的 80%), 分子大小适中, 存在于所有的生物中, 特别是其进化具有良好的时钟性质, 在结构与功能上具有高度的保守性, 素有 “细菌化石” 之称。rRNA 是细菌和真核细胞核糖体的基本组成部分, 编码 rRNA 的基因是按 5' -16S-23S-5S-3' 方式排列的, 由两个非编码的间隔区序列分开。Cai H Y 等<sup>[5]</sup>认为, rRNA 基因序列已成为一个分子指标, 可以广泛地用于各种微生物的遗传特征和分子差异的研究。16SrDNA、23SrDNA 和 5SrDNA 三部分组成一个 RNA 操纵子, 这个操纵子作为一个单位进行转录, 转录后处理成为成熟的 16SrRNA、23SrRNA 和 5SrRNA。rRNA 结构既具保守性又具高变性。保守性反映生物物种的亲缘关系, 高变性则揭示生物物种的特征核酸序列, 是属种鉴定的分子基础。16SrRNA 基因大小适中, 约 1.5Kb 左右, 含有高度保守的基因片段, 同时在不同的菌株间也含有变异的核酸片段。因其既能体现不同菌属之间的差异, 又能利用测序技术快速得到核酸序列, 已成为理想的未知菌种 (株) 基因鉴定靶序列<sup>[6]</sup>。

要对 16SrRNA 基因 (或其局部) 进行测序, 通常是通过 PCR 扩增手段获得该基因或基因片段。选用的 PCR 扩增引物及测序引物对应的序列是 16SrRNA 中高度保守的序列, 其中 PCR 引物 8~27 位的 16 (+) 和 1512~1492 位的 16 (-) 扩增待测细菌的 16SrRNA 全基因; 选择位于 8~27 位的 16 (+)、683~702 (N3R) 和 1512~1492 位的 16 (-) 保守序列作为测序引物, 可准确测定 16SrDNA 的一部分序列。根据核糖体 16SrRNA 结构变化规律, 在所测定的区域中包括了 V1、V2、V3 和 V4 四个高变区, 尤其是 V2 这一高

变区（图1-1），由于进化速度相对较快，其中所包含的信息，足够用于物种属及属以上分类单位的比较分析。因此，测定16SrDNA部分序列即可达到对菌种（株）的分子鉴定目的<sup>[7]</sup>。

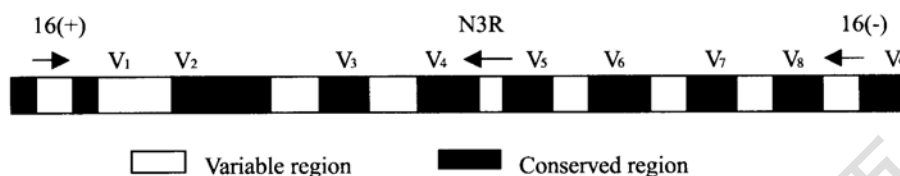


图1-1 16SrRNA基因结构模式

Fig. 1-1 Diagram of 16SrRNA gene structure

有了微生物16SrRNA基因序列，不论是全长还是部分，都可以提交到GenBank采用BLAST程序与已知序列进行相似性分析。GenBank将按照与测得序列的相似性高低列出已知序列名单、相似性程度以及这些序列相对应的微生物种类，但更为精确的微生物分类还取决于系统发育分析<sup>[8]</sup>。系统发育分析，就是根据能反映微生物亲缘关系的生物大分子（如16SrDNA、ATP酶基因）的序列同源性，计算不同物种之间的遗传距离，然后采用聚类分析等方法，将微生物进行分类，并将结果用系统发育树（phylogentic tree）表示。计算菌属、菌种之间的遗传距离可以采用不同方法，如Jukes Cantor方法。在计算遗传距离之后，构建进化树时有许多种方法，其中以Neighbor Join法最为常用。在进行系统发育树分析时常用到的一些软件包括MEGA和Phylip等。国内外目前比较通用的几种16SrRNA基因PCR扩增引物见表1-1<sup>[9]</sup>。

16SrRNA序列分析是一种非培养分析技术<sup>[10]</sup>，能快速鉴定目前尚不能人工培养的微生物。若两菌的16SrRNA同源性大于99%，且染色体DNA杂交率大于70%，基因水平上则可视同一种细菌。

此外，16S~23SrRNA间区（Intergenic Spacer Region, ISR）研究近几年来已成为新的探究热点<sup>[11]</sup>，在细菌分类鉴定中倍受关注。16S~23SrRNA的ISR序列作为16SrRNA序列系统分类的一个有力补充，可根据细菌间ISR的数目、长度、种类和序列的不同进行分类。16S~23SrRNA的ISR序列作为细菌分类新的目标基因具有属、种、型、株的特异性与灵敏性。ISR作为细菌分类鉴定的研究热点，具有无可比拟的优越

性，有望为细菌系统演化带来新的飞跃。

表1-1 目前比较通用的几种16SrRNA基因PCR扩增引物

Tab. 1-1 The universal primers for the PCR of 16SrRNA gene

引物	5'- 3'	适用范围
fD1	ccgaattcggtcgacaacAGAGTTTGATCCTGGCTCAC	大多数真细菌
fD2	ccgaattcggtcgacaacAGAGTTTGATCATGGCTCAC	肠道细菌及相关细菌
fD3	ccgaattcggtcgacaacAGAGTTTGATCCTGGCTTAG	<i>Spirochete</i> 疏螺旋体
fD4	ccgaattcgacaacAGAATTTGATCTTGGTTCAG	衣原体属
rD1	cccgggatccaagcttAAGGAGGTGATCCAGCC	许多真细菌
rP1	cccgggatccaagcttACGGTTACCTTGTTACGACTT	肠道细菌
rP2	cccgggatccaagcttACGGCTCCTTGTTACGCTT	大多数真细菌
rP3	cccgggatccaagcttACGGATACCTTGTTACGACTT	梭杆菌

注：小写代表连接序列，“f”连接序列中包含*EcoR* I和*Sal* I位点；“r”连接序列中包含*Hin* dIII, *Bam* HI和*Xma* I位点。

#### 1.1.6.8 微生物全基因组测序

微生物全基因组测序是当前国际生命科学领域中掌握微生物全部遗传信息的最佳途径。1990年10月1日人类基因组计划（Human Genome Project, HGP）的正式启动极大地推动了微生物基因组学和微生物蛋白质组学的飞速发展,1995年7月科学家首次报道了流感嗜血杆菌的全基因组序列（1.8Mb）。至2004年已正式公布的微生物基因组序列有53种，正在进行测序的至少有100余种，由此迎来了“后基因组生物学时代”<sup>[12]</sup>。

### 1.2 嗜盐单胞菌的研究现状

嗜盐菌（*Halophiles*）即在高盐（主要是NaCl）条件下生长的细菌，它主要生长在盐湖（中国的青海湖、美国大盐湖）、死海（黎巴嫩）、盐场等浓缩海水，以及腌鱼、盐兽皮等盐制品上。根据对盐的耐受程度，可将此类菌分为六类：非嗜盐

菌，轻度嗜盐菌，中度嗜盐菌，边缘极端嗜盐菌，极端嗜盐菌，耐盐菌（表1-2）。中度嗜盐菌（Moderate halophile）是一类耐盐性很强的细菌，它们可在1%~325%的NaCl浓度条件下生长，最适生长的NaCl浓度为50%~100%。其独特的生活能力、细胞组成和生理机制，特别是渗透调节的方式已引起科学家的浓厚兴趣。

表 1-2 不同盐浓度下生存的微生物

Tab.1-2 The microorganisms survived under different NaCl concentrations

分类	盐浓度	举例
非嗜盐菌	在含 0.2mol/L 盐的培养基中生长最好	多数普通真细菌和多数淡水微生物
轻度嗜盐菌	在含 0.2~0.5mol/L 盐的培养基中生长最好	很多海洋微生物
中度嗜盐菌	在含 0.5~2.5mol/L 盐的培养基中生长最好，能在低于 0.1mol/L 盐中生长的被认为是兼性嗜盐菌	<i>Vibrio costicola</i> , <i>Paracoccus halodenitrificans</i> , <i>Pseudomonas</i> sp.
边缘极端嗜盐菌	在含 1.5~4.0mol/L 盐的培养基中生长最好	<i>Extothiorhodospira halophila</i> , <i>Actinopolyspora halophila</i> , <i>Halobacterium volcanii</i>
极端嗜盐菌	在含 2.5~5.2 mol/L（饱和）盐的培养基中生长最好	<i>Halobacterium salinarium</i> , <i>Halococcus morrhuae</i>
耐盐菌	能耐盐的非嗜盐菌。若生长范围超过 2.5mol/盐可被认为是极端耐盐微生物	<i>Staphylococcus epidermidis</i> , Solute-tolerant yeasts , fungi

### 1.2.1 中度嗜盐菌的研究现状

随着分子生物学技术的广泛应用，中度嗜盐菌遗传多样性的研究得到迅速发展，新种和新属不断被报道。迄今发现的中度嗜盐菌已有一个科、6个属、31个种。目前，我国中度嗜盐菌只进行过零星的报道，还未对此类菌种资源进行系统的调查和分类研究。如，曾静等<sup>[13]</sup>（2002）在新疆的艾丁湖、艾比湖和达板湖等盐湖中，分

离纯化 29 株耐盐范围在 0%~25%NaCl 的中度嗜盐菌, 2003 年李卫等<sup>[14]</sup>从青岛附近盐渍海产品中分离得到两株盐单胞菌 CM1 和 CM4, 2004 年洪青等<sup>[15]</sup>从活性污泥中分离的中度嗜盐菌 *Halomonas* sp. BYS21。本实验室<sup>[16,17]</sup>的张会永同学和谭静同学(2001) 分别从盐场的饱和盐水中分离得到 1 株淡黄色的革兰氏阴性杆菌 (*Pseudomonas* sp.) 和 1 株盐生盐杆菌 (*Halobacterium halobium*)。

中度嗜盐菌 (Moderately halophilic bacteria) 耐盐的主要机制主要与其细胞内存在各类相容性溶质 (Compatible solutes) 有关。四氢嘧啶 (ectoine) 是大多数中度嗜盐菌中主要的相容性溶质。何建等 (2005) 从草地土壤中分离到一株中度嗜盐菌 I15, 发现 I15 细胞内主要的相容性溶质为四氢嘧啶, 占相容性溶质总摩尔含量的 89.6%。渗透冲击试验表明 I15 细胞内四氢嘧啶在低渗冲击时能够快速分泌到细胞外, 在高渗冲击时能较快地重新合成<sup>[18]</sup>。还有些中度嗜盐菌 (*Halomonas* sp. BYS21) 主要通过积累 K<sup>+</sup>、谷氨酸和甜菜碱来调节胞内外的渗透压平衡。当培养基中的 NaCl 浓度从 0.1mol/L 上升到 2.0mol/L 时, 其胞内的 K<sup>+</sup>、谷氨酸和甜菜碱分别提高了 1.9、2.4 和 13.6 倍<sup>[15]</sup>。

随着分子生物学的发展, 洪青等人<sup>[19]</sup> (2005) 构建了中度嗜盐菌 *Halomonas* sp. BYS21 的启动子文库及基因文库, 对启动子活性和耐盐相关片段进行研究。何建等人<sup>[20,21]</sup>利用 SEFA-PCR 技术从中度嗜盐菌 *Halomonas* sp. BYS21 总 DNA 中克隆了四氢嘧啶合成基因 *ectABC* 及其上游序列; 将包含 *ectABC* 基因及其上游 1000bp 序列的片段克隆到 pUC19 中并转化 *E.coli* DH5  $\alpha$ , 转化子 *E.coli* (pUC19ECT) 能够在盐激条件下合成四氢嘧啶, 但其耐盐能力没有得到显著改善。张薇等 (2006) <sup>[22]</sup>分离中度嗜盐菌 DTY1, 高压液相色谱分析 DTY1 在最适盐浓度条件下, 盐浓度越高单位干重菌体所产生的四氢嘧啶含量越高。并通过 PCR 介导的方法从 DTY1 中克隆 *ectB*。

在蛋白质组学方面, 许多研究者现阶段主要研究中度嗜盐菌的细胞膜蛋白, 通过在不同盐浓度下的分析, 对盐单胞菌的抗盐机理机制、渗透调节机制有了初步了解。革兰氏阴性细菌外膜蛋白对细菌外部环境因素的应答功能已受到高度重视, 但有关细菌质膜作用的报道却极少。为研究质膜蛋白在抗盐机制中所起的作用, 吴丽娜等 (2005) <sup>[23,24]</sup>采用蛋白质组学技术比较深海中度嗜盐菌 *Halomonas aquamarina*



Degree papers are in the "[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)". Full texts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to [etd@xmu.edu.cn](mailto:etd@xmu.edu.cn) for delivery details.

厦门大学博硕士论文摘要库